

学位論文の要旨

氏名	小 薄 健 一
学位論文題目	根粒の着生制御におけるミヤコグサの β -1,3-glucanaseの機能に関する研究 (Functional analysis of a β -1,3-glucanase of <i>Lotus japonicus</i> in the regulation of root nodule formation)

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定は、農業生産上極めて重要な共生系である。即ち、マメ科植物は、根に着生した根粒細胞内に存在する根粒菌に光合成産物を炭素源として供給し、一方、根粒内の根粒菌は、大気中の窒素ガスをアンモニアへと還元し、マメ科植物へ窒素源として供給する。しかし、過剰な根粒着生は、エネルギー消費が大きく宿主植物の生育を阻害するため、宿主植物には、根粒着生を制御する機構が存在する。本論文は、ミヤコグサの病原抵抗性遺伝子のひとつである β -1,3-glucanase遺伝子 (*LjGlul*) に着目し、その機能を根粒着生の制御機構と関連付けながら解析したものである。

第1章は序章である。根粒菌の宿主植物への感染・侵入から根粒形成、窒素固定活性の発現と共生成立に至る過程とそこに関与するシグナル伝達系を概説した。さらに、根粒着生の制御機構について、これまでの知見を網羅して整理し、取り組むべき課題とその意義を明確にした。

第2章では、根粒着生の制御機構と植物ホルモンのひとつであるアブシシン酸の関係について検討した。根粒着生の制御機構は、根での局所的制御機構と地上部を介した全身的制御機構が存在すると考えられる。まず、ミヤコグサを材料としてスプリットルートシステムを構築し、全身的制御と局所的制御を明確に見分けることが可能な実験系であることを示した。この実験系にアブシシン酸、及び、その合成阻害剤であるアバミンを適用し、(1)アブシシン酸は、根粒菌の接種に応答して宿主植物の根組織で合成されること、(2)アブシシン酸による根粒着生阻害は根での局所的なものであり、アブシシン酸は、全身的な制御に関与するシグナル分子そのものではないことを示唆した。

第3章では、*LjGlul*遺伝子の発現と根粒着生制御機構の関係を検討した。内生アブシシン酸の量が多いミヤコグサ変異体では、根粒着生が極度に抑制される。そこで、この変異体で発現が上昇している遺伝子を網羅的に調査した結果、病原抵抗性に関与する酵素である β -1,3-glucanaseの遺伝子が選抜され、*LjGlul*と名付けた。*LjGlul*遺伝子が根での根粒着生制御に関係している可能性があると考え、その発現を抑制したところ、根粒着生数が増加した。さらに、全身的な根粒着生制御との関係を探るために、根からの根粒着生シグナル (CLEペプチド) が恒常的に合成されているミヤコグサ変異体、及び、地上

部の遺伝子 (*HAR1*) の変異により全身的な根粒着生制御が機能しない変異体における *LjGlu1* 遺伝子の発現を解析した。その結果, *LjGlu1* 遺伝子の発現は, *HAR1* 遺伝子に調節されていることが判明した。しかし, 根粒着生抑制シグナルが, 地上部の *HAR1* タンパク質から根へと伝えられても, 根でのアブシシン酸の量は上昇しないことから, *LjGlu1* 遺伝子の発現は, 少なくとも二つの異なる経路で調節されていると考えた。

第4章では, 植物ホルモンや生物学的ストレスに対する *LjGlu1* 遺伝子の発現応答を特徴づけた。根粒形成に関与していると予想されている植物ホルモンであるメチルジャスモン酸, エチレン, サイトカイニンをミヤコグサに与え, *LjGlu1* の遺伝子発現を解析した。その結果, *LjGlu1* は, 根粒着生に抑制的に作用するエチレンとサイトカイニンに応答して発現することが明らかとなった。窒素源は, 根粒着生を強く抑制することが知られている。根粒着生が完全に抑制される濃度の硝酸態窒素を与えたミヤコグサの根では, *LjGlu1* 遺伝子が強く発現していた。また, 根に青枯病菌を接種すると, *LjGlu1* 遺伝子の発現が誘導されることを見いだした。即ち, *LjGlu1* 遺伝子は, 根粒着生を抑制する要因に応答して発現することが示唆された。

第5章では, *LjGlu1* タンパク質の生理活性と根系における所在を検討した。*LjGlu1* 遺伝子の塩基配列から, *LjGlu1* タンパク質は分泌性の β -1,3-glucanase と予想されていた。そこで, 大腸菌を用いて *LjGlu1* 組換えタンパク質を生産し, その酵素活性を検討したところ, *LjGlu1* タンパク質は, 確かに β -1,3-glucanase の活性をもつことが明らかとなった。*LjGlu1* タンパク質と蛍光タンパク質 *mOrange* の融合遺伝子を構築し, ミヤコグサに形質転換した。根粒菌接種7日後の根を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果, 根毛周辺の根粒菌に *mOrange* の蛍光が観察された。根粒菌接種28日後の根粒内部を観察したところ, *mOrange* の蛍光は, 根粒内部の細胞間隙に観察された。これらのことから, *LjGlu1* タンパク質は細胞外に分泌され, 根圏の根粒菌に直接作用して根粒着生を抑制することが考えられた。*LjGlu1* タンパク質を十分量生産することは困難であったため, 市販の β -1,3-glucanase とミヤコグサ根粒菌を混合してミヤコグサに接種し, 感染効率を観察した。その結果, β -1,3-glucanase の添加により感染効率が低下することが判明した。さらに, 根粒着生数は, 無添加区より少ない傾向にあった。

第6章は研究の総括であり, 根粒着生制御機構における *LjGlu1* タンパク質の機能について議論した。根粒着生を抑制する経路はいくつか存在すると予想されるが, 根で機能する遺伝子のひとつが *LjGlu1* 遺伝子と考えられる。*LjGlu1* タンパク質の具体的機能の解明は, 今後の研究を待たなければならないが, *LjGlu1* タンパク質が根粒菌の表層多糖に作用し, その分解産物が植物に認識されて病原応答が誘導され, その結果, 根粒着生が抑制されるという経路を提案した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Functional analysis of a β -1,3-glucanase of *Lotus japonicus* in the regulation of nodule formation

Name: Ken-ichi OSUKI

This thesis comprises 6 Chapters. Leguminous plants utilize atmospheric nitrogen as N-source by symbiotic nitrogen fixation with rhizobia. This symbiosis allows legumes to survive in nitrogen-limiting environments. However, excessive root nodule formation can inhibit plant growth. Therefore, host legumes strictly control nodule formation. In this thesis, physiological function of a β -1,3-glucanase of *Lotus japonicus* is mainly discussed in the regulation of nodule formation.

Chapter 1 gives a general introduction of legume-rhizobium symbiosis and the regulation of nodule formation.

In Chapter 2, a split-root culture system of *Lotus japonicus* was established to investigate the function of a phytohormone abscisic acid (ABA) in the regulation of nodulation. Abamine, an inhibitor of biosynthesis of ABA, was also employed. Although ABA inhibited nodulation, ABA was not a signal molecule of the systemic regulation of nodulation.

In Chapter 3, expression profile of *LjGlu1*, one of the β -1,3-glucanase genes of *L. japonicus*, was characterized. *LjGlu1* was identified as one of the genes that were strongly induced by ABA. The expression of *LjGlu1* was controlled by HAR1, a main regulator of the systemic regulation of nodulation. However, ABA did not increase in the regulation of nodulation mediated by HAR1. RNAi of *LjGlu1* increased the number of nodules. These results suggest that the expression of *LjGlu1* is regulated by at least two different pathways, *i.e.* ABA-dependent and ABA-independent pathway, and that *LjGlu1* is induced to inhibit nodulation.

In Chapter 4, the expression profile of *LjGlu1* was further investigated. *LjGlu1* was induced not only by phytohormones ethylene and cytokinin that inhibit nodulation but also by nitrate. Inoculation of a plant pathogen, *Pseudomonas syringae*, also induced *LjGlu1*.

In Chapter 5, enzymatic activity and localization of LjGlu1 were investigated. LjGlu1 was predicted as a secret β -1,3-glucanase by its amino acid sequence. The recombinant protein of LjGlu1 clearly showed the enzymatic activity of β -1,3-glucanase. The fusion protein of LjGlu1 and mOrange was secreted from root tissue and associated with rhizobial cells colonized on the surface of the root hairs of *L. japonicus*. These findings suggest that LjGlu1 secreted from the root associates with the rhizobial cells and inhibits penetration of rhizobia into the root hair cells.

Chapter 6 summarizes the presented results and gives discussion on the function of LjGlu1 in the regulation of nodule formation. A new idea that LjGlu1 degrades the polysaccharides of rhizobia and produces a kind of elicitor that induces defense system of the host plant is proposed for the function of LjGlu1 in the regulation of nodule formation.